



BEST AVAILABLE COPY

①

CH PATENTSCHRIFT

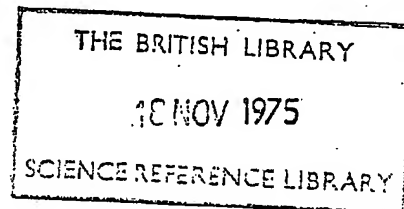
A5

⑪

568 392

N

- ②① Gesuchsnummer: 12972/72
- ⑥① Zusatz zu:
- ⑥② Teilgesuch von:
- ②② Anmeldungsdatum: 8. 9. 1972, 7 $\frac{1}{2}$  h
- ③③ ③② ③① Priorität: Bundesrepublik Deutschland,  
11. 9. 1971 (2145477)



- Patent erteilt: 15. 9. 1975
- ④⑤ Patentschrift veröffentlicht: 31. 10. 1975

- ⑤④ Titel: Verfahren zum Züchten eines zur Herstellung eines  
Pockenschutz-Impfstoffes bestimmten Virus

- ⑦③ Inhaber: Freistaat Bayern vertreten durch Bayerisches Staatsministerium des Innern,  
München (Bundesrepublik Deutschland)

- ⑦④ Vertreter: George Römpler, Heiden

- ⑦② Erfinder: Prof. Dr. med. Anton Helmut Stickl, Krailing (Bundesrepublik Deutschland)

B1

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Züchten eines zur Herstellung eines Pockenschutz-Impfstoffes bestimmten Virus.

Bei der bisher üblichen Impfung gegen Pocken unter Verwendung eines stark reaktogenen Impfstammes und unter Anwendung der epicutanen Skarifikation bei Insertion des Virus kommt es in bestimmtem zeitlichem Ablauf zur Ausbildung einer Impfpustel. Letztere ist Ausdruck eines infektiös-allergischen Geschehens, wobei zellulär-allergische Reaktionen im Vordergrund stehen.

Es ist eine schon seit längerer Zeit bekannte Tatsache, dass die Reaktogenität einer Impfung nicht identisch ist mit deren Immunogenität. Dies bedeutet, dass starke Impfreaktionen nicht auch zu einem starken Infektionsschutz gegenüber dem krankmachenden Variola-Virus führen müssen. Diese Erkenntnis war in den letzten Jahren Grund für die Einführung des weniger reaktogenen Impfstammes Elstree, allerdings auch unter Anwendung der epicutanen Skarifikation.

Der Nachteil dieser Art der Pockenschutz-Impfung besteht darin, dass sie in nicht seltenen Fällen, besonders wenn es zu einer zusätzlichen Sensibilisierung gekommen ist, zu EEG-Veränderungen führt. Ursache hierfür sind phylogenetisch angelegte funktionelle Brücken zwischen Zentralnervensystem und Haut.

Aus diesem Grunde erscheinen die Forderungen, bei der Pockenimpfung eine cutane Pustelreaktion herbeizuführen und gleichzeitig eine risikofreie Impfung durchführen zu wollen, miteinander nicht vereinbar; denn so lange eine so ausgeprägte immun-allergische Reaktion an der Haut erzwungen wird, kann nicht verhindert werden, dass nicht auch neuroallergische Begleitreaktionen am Zentralnervensystem auftreten.

Man hat daher versucht, mit sogenannten «Attenuierten Impfstoffen» zu arbeiten. Alle dieser Versuche gingen davon aus, dass normales Vaccinia-Virus über 20 bis 50 Passagen auf der Chorioallantoismembran gezüchtet wurde und dann in einer relativ hohen Konzentration bei der Impfung zur Anwendung kam. Die Passage des Impfvirus über den Hühner-Embryo führte in der Tat zu einer Selektion nicht einheitlicher Impfstämme, so dass nach mehreren Kulturen ein genetisch im wesentlichen einheitlicher Impfstamm gewonnen werden konnte. Ferner kam es bei diesen Impfstoffen zu einem Rückgang der Reaktogenität, d. h. dass die lokale Impfreaktion milder war und weniger Impffieber auftrat. Auch die Virämierate bei Impfung mit solchen Impfstoffen ist deutlich reduziert. Aber auch bei dieser Methode wurde nicht auf die pustulöse Impfreaktion verzichtet. Dementsprechend waren bei Impfungen mit diesen Impfstämmen ebenfalls zentralnervöse Komplikationen mit fast der gleichen Erwartungsfrequenz wie nach Impfung mit konventionellen Impfstoffen eingetreten.

Schliesslich hat man auch schon versucht, mit normalen Impfstoff entweder subcutan zu impfen – das ergab bis zu 60% Schwellungen im Unterhautgewebe – oder aber intracutan – das ergab ebenfalls wieder Pusteln und zwar mit Gewebenektrosen.

Die Erfindung bezweckt, ein Verfahren zum Züchten eines zur Herstellung eines Pockenschutz-Impfstoffes bestimmten Virus zu schaffen, das die Nachteile des bisher verwendeten Virus in bekannten Pockenschutz-Impfstoffen nicht aufweist.

Das erfindungsgemässe Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass das Vaccinia-Virus Ankara in mindestens 300 Zellkulturpassagen in Tierzellen gezüchtet wird, bis auf der Chorioallantois-Membran der attenuierte Vaccinia-Virus in kleinen rein proliferativen Herden (Knötchen) wächst.

Nachfolgend werden Ausführungsbeispiele des erfindungsgemässen Verfahrens beschrieben.

Das Vaccinia-Virus Ankara wird in mindestens 300 Zellkulturpassagen in Tierzellen gezüchtet, vorzugsweise in über 500

Zellkulturpassagen in Hühnerfibroblastenzellen oder in mindestens 400 bis über 500 Zellkulturpassagen in Schweinsnierenzellen. Die Zellkulturpassagen werden so lange durchgeführt, bis auf der Chorioallantois-Membran der attenuierte Vaccinia-Virus in kleinen, rein proliferativen Herden bzw. Knötchen wächst.

Der Impfstoff Ankara ist von der WHO anerkannt. Näheres über ihn ist im Handbuch der Schutzimpfungen, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg 1965 beschrieben. Weiter wird das Vaccinia-Virus Ankara erwähnt in «Strains of Human Viruses» von M. Majer und S. A. Plotkin, S. Karger-Verlag, Basel 1972, sowie in der Deutschen Medizinischen Wochenschrift vom 22. November 1974.

Ein so gezüchtetes Vaccinia-Virus Ankara ist genetisch einheitlich und in seiner Reaktogenität und Virulenz durch die Zellpassagen abgeschwächt.

Ein ccm des Fertig-Impfstoffes in gereinigter lyophilisierter Form soll etwa  $10^7$  Viruspartikel enthalten. Davon werden 0,1 ccm bis maximal 0,2 ccm intracutan injiziert. Damit ist eine genauere Dosierung als bei den bisher bekannten Impfverfahren möglich. Ausserdem ist aber eine Kontrolle des Impfverlaufs dadurch gegeben, dass sich an Ort und Stelle der Injektion Rötung, leichte Schwellung mit Durchmesser von 4 × 8 mm und manchmal auch Juckreiz zeigen. Es kommt aber auf keinen Fall zu einer pustulösen Impfreaktion. Eine humorale, d. h. serumgebundene, und gewebliche Sensibilisierung bzw. Allergie, in klinisch nennenswerter Form tritt also nicht ein. Jedoch ist eine celluläre Immunität, die eine Ausbreitung und Vermehrung im Gewebe verhindert, nachweisbar.

Bei Anwendung eines solchen Impfstoffes läuft die Impfreaktion ohne Fieber und beeinträchtigende andere Allgemeinerscheinungen ab, im Gegensatz zur Verwendung von bisher bekannten Impfstoffen, bei denen zuweilen Krankheitserscheinungen wie Impffieber, Impf-Ulcus oder Impf-Exanthem und sogar Gehirnzellen-Entzündung auftreten, was stets zu bleibenden Schäden, wenn nicht zum Tode, führt.

Nach Ablauf von 8 Tagen nach der Injektion bilden sich Rötung und Schwellung zurück. Es bleibt dann aber zunächst am Ort der Injektion noch ein kleines gelblich-bräunliches Knötchen zu sehen und zu tasten; das jedoch spätestens nach 21 Tagen vollständig verschwindet.

Ein weiterer wesentlicher Vorteil des mit dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellten Virus ist darin zu sehen, dass durch seine Anwendung eine vaccinale Basisimmunität geschaffen werden kann, die verhindert, an den vorgenannten Komplikationen der bekannten Impfverfahren zu erkranken. Wenn diese Basisimmunität vorhanden ist, dann können alle weiteren bekannten Pockenschutz-Impfungen nicht mehr zur Gehirnzellen-Entzündung führen. Ein solcher Impfstoff ist daher geeignet, die Impfung bei bisher durch Alter oder Krankheit bedingten Impfhindernissen gefahrlos durchzuführen.

#### PATENTANSPRUCH

Verfahren zum Züchten eines zur Herstellung eines Pockenschutz-Impfstoffes bestimmten Virus, dadurch gekennzeichnet, dass das Vaccinia-Virus Ankara in mindestens 300 Zellkulturpassagen in Tierzellen gezüchtet wird, bis auf der Chorioallantois-Membran der attenuierte Vaccinia-Virus in kleinen rein proliferativen Herden (Knötchen) wächst.

#### UNTERANSPRÜCHE

1. Verfahren nach Patentanspruch, dadurch gekennzeichnet, dass das Vaccinia-Virus Ankara in über 500 Zellkulturpassagen in Hühnerfibroblastenzellen gezüchtet wird.

2. Verfahren nach Patentanspruch, dadurch gekennzeichnet, dass das Vaccinia-Virus Ankara in mindestens 400, vorzugsweise in über 500 Zellkulturpassagen in Schweinsnierenzellen gezüchtet wird.

# BEST AVAILABLE COPY

File 351:DERWENT WPI 1963-1998/UD=9834;UP=9831;UM=9829

(c)1998 Derwent Info Ltd

\*File 351: All images are now present. The display formats have changed for 1998. See HELP FORM 351 for more information.

Set Items Description

?e pn=ch 568392

Ref	Items	Index-term
E1	1	PN=CH 568390
E2	1	PN=CH 568391
E3	1	*PN=CH 568392
E4	1	PN=CH 568393
E5	1	PN=CH 568394
E6	1	PN=CH 568395
E7	1	PN=CH 568396
E8	1	PN=CH 568397
E9	1	PN=CH 568398
E10	1	PN=CH 568399
E11	1	PN=CH 568400
E12	1	PN=CH 568401

Enter P or PAGE for more

?s e3

S1 1 PN="CH 568392"

?t 1/9/1

1/9/1

DIALOG(R)File 351:DERWENT WPI

(c)1998 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

000933659

WPI Acc No: 73-10880U/197308

**Smallpox vaccine - contg modified attenuated vaccinia virus**

Patent Assignee: FREISTAAT BAYERN, REPRESE (FRE -N)

Number of Countries: 003 Number of Patents: 004

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Main IPC	Week
BE 787901	A						197308 B
DE 2145477	A						197313
CH 568392	A	19751031					197546
DE 2145477	B	19760401					197615

Priority Applications (No Type Date): DE 2145477 A 19710911

Abstract (Basic): BE 787901 A

The vaccine is prepd. by cultivating vaccinia strain Ankara by >500 passages through chicken fibroblast cells to produce a modified, genetically uniform virus, which is attenuated w.r.t. reactogenicity and virulence. It does not produce local reactions, e.g. postulations, ulceration or eruptions, or vaccination fever or CNS complications such as encephalitis.

Title Terms: SMALLPXO; VACCINE; CONTAIN; MODIFIED; ATTENUATE; VACCINIA; VIRUS

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Additional): A61K-039/14; C12K-007/00

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B02-V; D05-H07

Chemical Fragment Codes (M1):

\*01\* V280 V270 P210 P434 M710 M421 M902

?logoff